UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CORRIENTES, REPÚBLICA ARGENTINA

BONPLANDIA

Tomo III | Setiembre de 1974 | Nº 11

Recuperación de la fertilidad en un híbidro interespecífico estéril de Arachis (Leguminosae)

Por A. KRAPOVICKAS [1], A. FERNANDEZ [2] y P. SEELIGMAN [3]

En diciembre de 1964 y enero de 1965 los Ings. Agrs. Herculano R. Ojeda y Juan C. Mendez, entonces docentes de la Cátedra de "Genética y Fitotecnia" de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Corrientes, realizaron algunos cruzamientos interespecíficos entre el maní cultivado y varias especies silvestres del género *Arachis*, obteniendo éxito al cruzar *A. Batizocoi* [4], silvestre de $2n = 20$ cromosomas con *A. hypogaea* cv. 'Colorado Manfredi', tetraploide, que actuara como polinizadora.

[1] Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Miembro de la Carrera del Investigador (CONICET).

[2] Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes.

[3] Instituto Miguel Lillo, Tucumán.

[4] *Arachis Batizocoi, A. Krapovickas et W. C. Gregory, nov. sp. Herba perennis, radice axonomorpha. Thallo centrali radiato-symetrico, erecto vel decumbente, ca. 40 cm long., florifero. Rami pauci, distichi, floriferi, procumbentes, usque 4 m long. Stipulae lanceolatae, subfalcatae, setosae, ad margines pilosae. Foliola 4, subrotunda, supra glabra, subtus parce pilosa, ad margines ciliata. Flores sessiles in spicis axillaribus 5-floribus dispositi. Tubus receptacularis filiformis, pilosus, ca. 4 cm longus. Calyx bilabiatus, labio superiore irregulariter 4-dentato, labio inferiore, integro, falcato, ca. 8 mm longus. Corolla flava; vexillum suborbiculare. ca. 10 mm long. x 15 mm lat.; carena falcata, ca. 10 mm longus. Antherae 8, 4 oblongae, longae et 4 parvae, rotundae. Stylus filiformis, ad apicem pilosus. Ovula 2. Fructus biarticulatus; paxillus ca. 10 cm long., istmo 0,5-4 cm long., articulis 10-15 mm long x 7-10 mm lat., pericarpio pauce reticulato. Chromosomata 2n = 20. Fig. 1, A et 2, A. Holotypus: Bolivia, dep. Santa Cruz, prov. Cordillera, Parapetí, 24-II-1958, leg. A. Krapovickas 9505 (LIL).*

Especie dedicada al Sr. Giordano José Batizoco, colaborador en los trabajos de cruzamientos de *Arachis* realizados en la Estación Experimental Agropecuaria (INTA) de Manfredi (prov. Córdoba, Argentina).

Del cruzamiento realizado se obtuvieron dos semillas, las que germinaron mucho antes que las de *A. Batizocoi*. Sobrevivió una sola de las plantas, la que resultó perenne como la madre y estéril por ser posiblemente triploide. Vivió aproximadamente 4 años. En la misma maceta, donde estaba la F_1, se detectaron plantas en 1968-69, que eran perfectamente fértiles y que se multiplicaban por sí solas. Estas nuevas plantas son anuales, tetraploides ($2n = 40$), tienen aspecto distinto de la F_1 y presentan caracteres combinados de los dos progenitores, *A. Batizocoi* y el cv. 'Colorado Mdi.'

Por tratarse de una nueva entidad biológica, de importancia teórica en lo que se refiere a la filogenia del maní y de importancia práctica por la posibilidad de introducir nuevos genes silvestres en el maní cultivado, proponemos para ella el nuevo nombre de *A. Batizogaea*, que resulta de la combinación de los nombres de las especies progenitoras.

Arachis Batizogaea Krap. et Fern., nov. sp.

Figs. 1, D y 2, C.

Herba annua. Thallo centrali erecto vel decumbente, ca. 50 cm long., radiato-symetrico; rami laterales decumbentes, radiato-symetrici. Stipulae subfalcatae, setosae, ad margines pilosae. Foliola 4, ovali-oblonga, supra glabra, subtus appressipila, ad margines pilosa. Flores paucae, sessiles, in spicis brevis axillaribus dispositi. Tubus receptacularis filiformis, pilosus, usque ad 55 mm long. Calyx bilabiatus, pilosus, labio superiore 4-dentato, labio inferiore integro, falcato, ca. 8 mm long. Vexillum suborbiculare, 14 mm long. x *18 mm lat., flavum ad centrum auratiumque ad marginem; carena falcata flavescens, ca. 13 mm long. Antherae 8, 4 oblongae, longae et 4 rotundae, parvae. Stylus filiformis, ad apicem pilosus. Ovula 2. Fructus biarticulatus, paxillus ca. 8 cm longus, istmo ca. 1 cm longo, articulis usque ad 17 mm long.* x *9 mm lat., pericarpio reticulato. Chromosomata 2n = 40.*

Holotypus: Argentina, prov. Corrientes, Corrientes, Facultad de Ciencias Agrarias, cult., 13-XII-1972, leg. A. Fernández 316 (CTES).

Planta anual. Raíz delgada, pivotante. Hipocótilo 3 a 6 cm long., con numerosas raicillas cortas y delgadas. Eje primario hasta 50 cm long., primero erecto y luego decumbente, de simetría radial, con 4 a 8 ramas basales y con inflorescencias en los nudos supe-

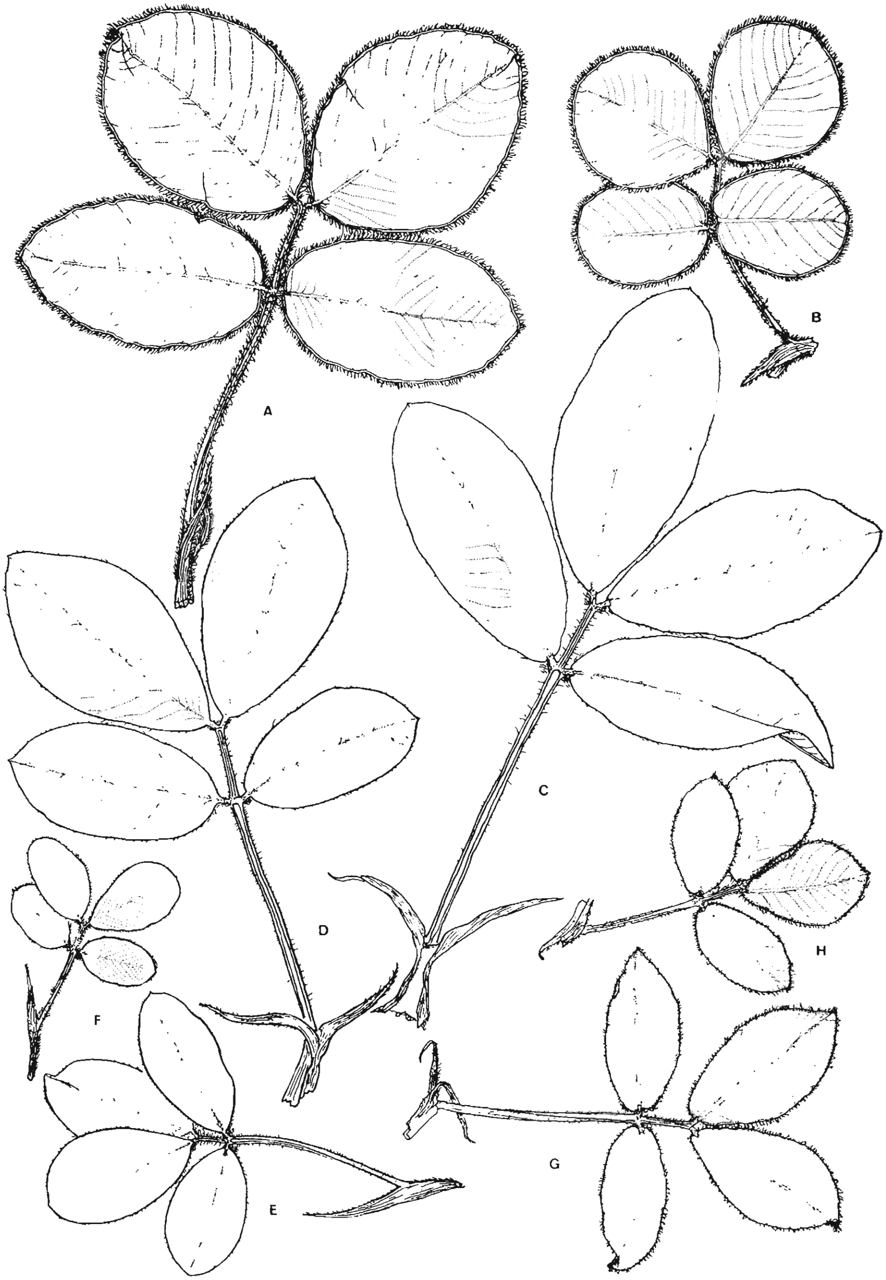


Fig. 1. — Hojas. *Arachis Batizocoi:* A, del eje central; B, de rama cotiledonar. *A. hypozagaea* cv. 'Colorado Manfredi': C, del eje central; D, de rama cotiledonar. *A. Batizocoi* × *A. hypogaea* (F_1): G, del eje central; H, de rama cotiledonar. *A. Batizogaea:* E, del eje central; F, de rama cotiledonar. Todos × 0,5.

riores. Ramas secundarias decumbentes, las cotiledonares hasta 50 cm long., de simetría radial, con ramas reproductivas casi exclusivamente o con ramas vegetativas y reproductivas alternando irregularmente, pero siempre con predominio de las reproductivas. Tallos angulosos, verdes, con largos pelos sedosos, blancos. Hojas biyugas, las del eje primario siempre mayores que las de las ramas laterales. Estípulas con cerdas en el dorso de la porción soldada, el resto glabro, excepto el margen de la porción libre que presenta largos pelos sedosos. Pecíolo y raquis canaliculados arriba, con pelos sedosos y algunas cerdas. Folíolos oval-oblongos, opuestos, el par apical siempre mayor que el basal; haz glabro, envés con pelos cortos adpresos y largos pelos sobre el nervio medio. Espigas axilares muy breves, con eje ca. 2 mm long., generalmente trifloras; cada flor con dos brácteas basales, la inferior entera, envuelve a la superior, la que es bífida, ambas con algunas cerdas. Tubo calicinal ca. 55 mm long. Cáliz bilabiado, con pelos largos y algunas cerdas; labio mayor 7,5 mm long. con una incisión media en el ápice de 1,8 mm long. y dos laterales de 2 mm; labio menor, falcado, 8 mm long. Estandarte suborbicular, amarillo en el centro y anaranjado hacia el margen, 14 mm long. x 18 mm lat.; cara superior estriada con líneas radiales rojas, que al nacer cerca de la base del estandarte forman un arco rojizo, interrumpido en el centro; estas líneas rojas son bien visibles en el centro amarillo y hacia la periferia son menos aparentes. Alas amarillas, 10 mm long. x 5 mm lat. Quilla falcada, amarillenta, estirada mide ca. 13 mm long. Anteras dimorfas, 4 oblongas, grandes, basifijas y 4 globosas, pequeñas, dorsifijas. Estilo filiforme, sobrepasa algo a los estambres; estigma piloso. Ovulos 2. Fruto de dos artejos uniseminados o más frecuentemente con un solo artejo por no haber desarrollado el distal. Clavos pardos en la parte aérea, tienen primero una inclinación de 45° con respecto a la rama, penetran en el suelo manteniendo esa misma inclinación, 1 a 2 cm y luego penetran verticalmente en el suelo unos 6 cm. Cuando hay dos artejos, éstos están separados por un istmo del grosor del clavo, de ca. 1 cm long., siendo algo mayor el artejo distal. Artejos hasta 17 mm long. x 9 mm lat., algo aplanados en el ápice y con pico de loro notable. Pericarpio tenaz, reticulado, con nervios longitudinales y transversales bien marcados. Epicarpio densamente cubierto de pelos delgados, blanquecinos, que retienen fuertemente una capa de tierra. La semilla llena completamente la cavidad de los artejos; testa de color ocráceo. Cromosomas $2n = 40$.

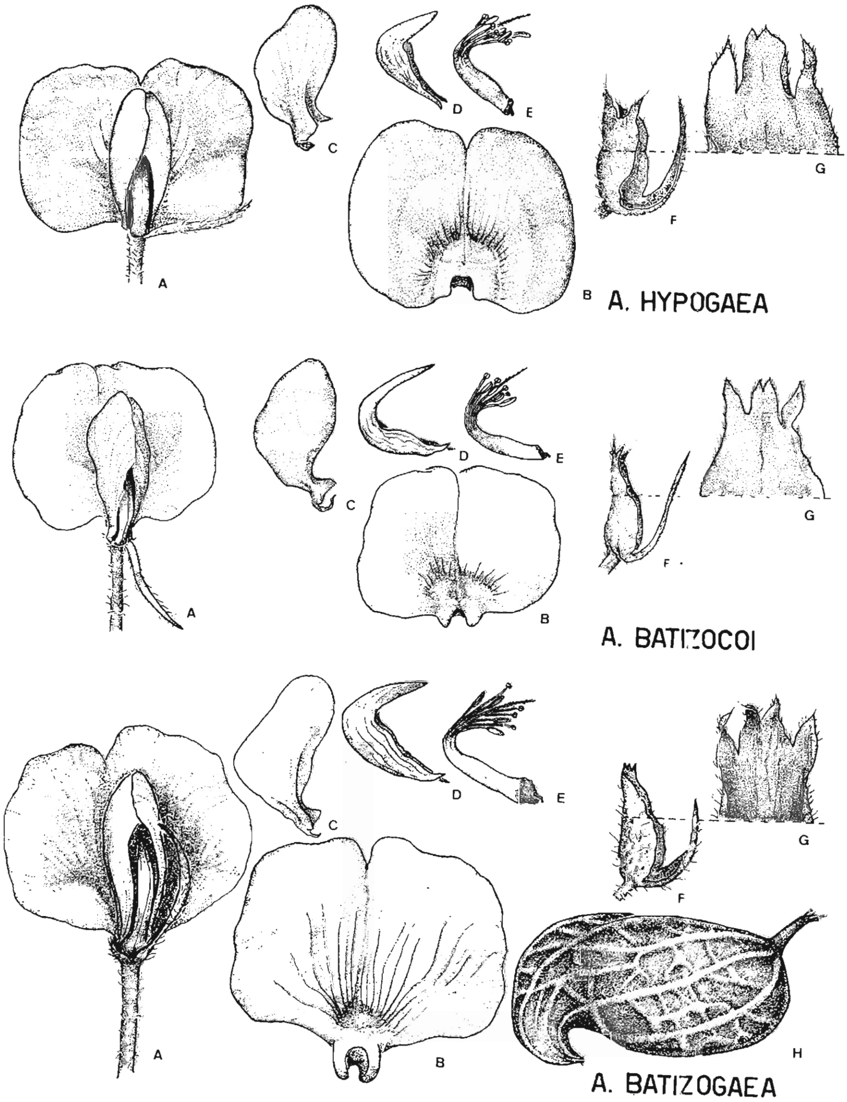


Fig. 2. — Caracteres florales: A, flor; B, estandarte; C, ala; D, quilla; E, androceo y estígma; F, cáliz; G, ápice del cáliz; H, fruto. A, B, C, D, E, F, × 1; G, H, × 2.

CUADRO I

Medidas de las partes de hojas *Arachis Batizogaea* (en mm)

Estípulas		Pecíolo	Raquis	Folíolos			
soldada	libre			par apical		par basal	
long.	long.	long.	long.	long.	lat.	long.	lat.
			Hojas de la rama primaria				
10	20	35	7	33	18	32	15
10	17	45	10	36	20	30	15
10	22	45	6	40	22	38	17
			Hojas de ramas secundarias				
10	12	18	6	25	14	20	11
5	13	18	6	22	16	21	12
10	12	25	6	28	18	26	15
7	13	17	5	26	16	22	11
			Hojas de ramas terciarias				
6	10	15	5	19	14	15	10

La nueva especie presenta combinados los caracteres de ambos progenitores, manteniéndose relativamente constante durante varias generaciones. De *A. Batizocoi* heredó la capacidad de reproducirse por sí sola, cualidad que carece *A. hipogaea,* que para su multiplicación depende de la mano del hombre. Se parece a su progenitor silvestre por el eje central o rama primaria decumbente, por las ramas secundarias con gran predominio de ramas reproductivas, por las espigas breves, paucifloras, por los carpelos biovulados y por el fruto biarticulado con istmo desarrollado. El fruto subterráneo biarticulado es un carácter que se encuentra en todas las especies del género *Arachis* con la sola excepción de *A. hipogaea.*

La especie sintética *A. Batizogaea* concuerda con *A. hipogaea* L. subsp. *fastigiata* Waldr. var. *fastigiata* cv. 'Colorado Manfredi' por ser anual, con ramas secundarias de simetría radial, de longitud similar, por el color de las flores, con el estandarte amarillo en el centro y anaranjado hacia el margen y por el pericarpio con nervios bien marcados. En todas las especies silvestres las ramas laterales son dísticas, encontrándose la simetría radial en el maní

cultivado, en razas y cultivares pertenecientes principalmente a la var. *fastigiata*. En general los frutos de las especies silvestres tienen el pericarpio casi liso con la excepción de *A. villosa* Benth. y *A. monticola* Krap. et Rig.

En *A. Batizogaea* el tamaño de las flores es algo mayor que en sus progenitores. El clavo tiene un crecimiento de forma intermedia, pues en *A. Batizocoi* tiene una posición inclinada en casi todo su trayecto y en *A. hypogaea* el clavo es casi vertical.

Las hojas de *A. Batizogaea* son bastante similares a las hojas de la F_1 estéril producto del cruzamiento entre *A. Batizocoi* y *A. hypogaea*. Sin embargo hay que hacer notar que *A. Batizocoi* tiene un notable dimorfismo foliar, siendo las hojas del primer año suborbiculares y las de los años siguientes oval-oblongos, similares a las de *A. Batizogaea*, pero en esta última, que es anual, las hojas con folíolos oval-oblongos aparecen desde el comienzo de su crecimiento.

Es notable el parecido entre *A. Batizogaea* con *A. monticola*, especialmente en lo que se refiere a la forma de las hojas, tamaño y color de las flores y al fruto biarticulado, con pericarpio con retículo notable. Se diferencian porque en *A. monticola* el eje central es bien erecto y las ramas laterales son procumbentes, dísticas y con alternancia regular de dos ramas vegetativas y dos reproductivas. En cambio en *A. Batizogaea*, el eje central es erecto cuando joven y luego decumbente y las ramas laterales son decumbentes, con simetría radial y presentando un gran predominio de ramas reproductivas.

ANALISIS CITOLOGICO (A. F.)

Los estudios mitóticos se hicieron en raicillas, las que fueron pretratadas con paclosol (paradiclorobenceno) durante 2 a 4 horas, a temperatura de laboratorio, fijadas en alcohol absoluto y ácido láctico (5:1) durante 24 horas, en refrigerador, conservadas en alcohol 70° y coloreadas con Feulgen.

Las preparaciones meióticas se obtuvieron fijando con alcohol absoluto y ácido acético (3:1) o con alcohol absoluto y ácido láctico (5:1) y coloreando con orceína acética o Feulgen (Fernández, 1973).

Arachis Batizocoi tiene $2n = 20$ cromosomas (Lám. L, C.) y tiene una meiosis regular, formando 10 bivalentes cerrados, como se puede apreciar en la Lám. I, A y B.

Arachis hipogaea cv. 'Colorado Manfredi' tiene 40 cromosomas somáticos, entre los cuales se distingue un par de cromosomas pequeños, que no posee *A. Batizocoi* (Lám. I, D).

En ambas especies se observa la presencia de un par de cromosomas con satélite, por lo cual puede ser individualizado con relativa facilidad. Este par tiene una característica muy notable, puesto que cuando se lo analiza en prometafase, el satélite se encuentra muy separado, sin que se distinga el filamento de unión. En estos casos es necesario analizar diferentes estados de la división mitótica para evitar posibles errores, pues el satélite se puede confundir en prometafase con cromosomas independientes. Dicho satélite es de gran tamaño y está unido al brazo corto de su cromosoma. Como el diámetro del satélite es superior a la mitad del diámetro del brazo del cromosoma, se trata de un macrosatélite, de acuerdo a la clasificación de Battaglia.

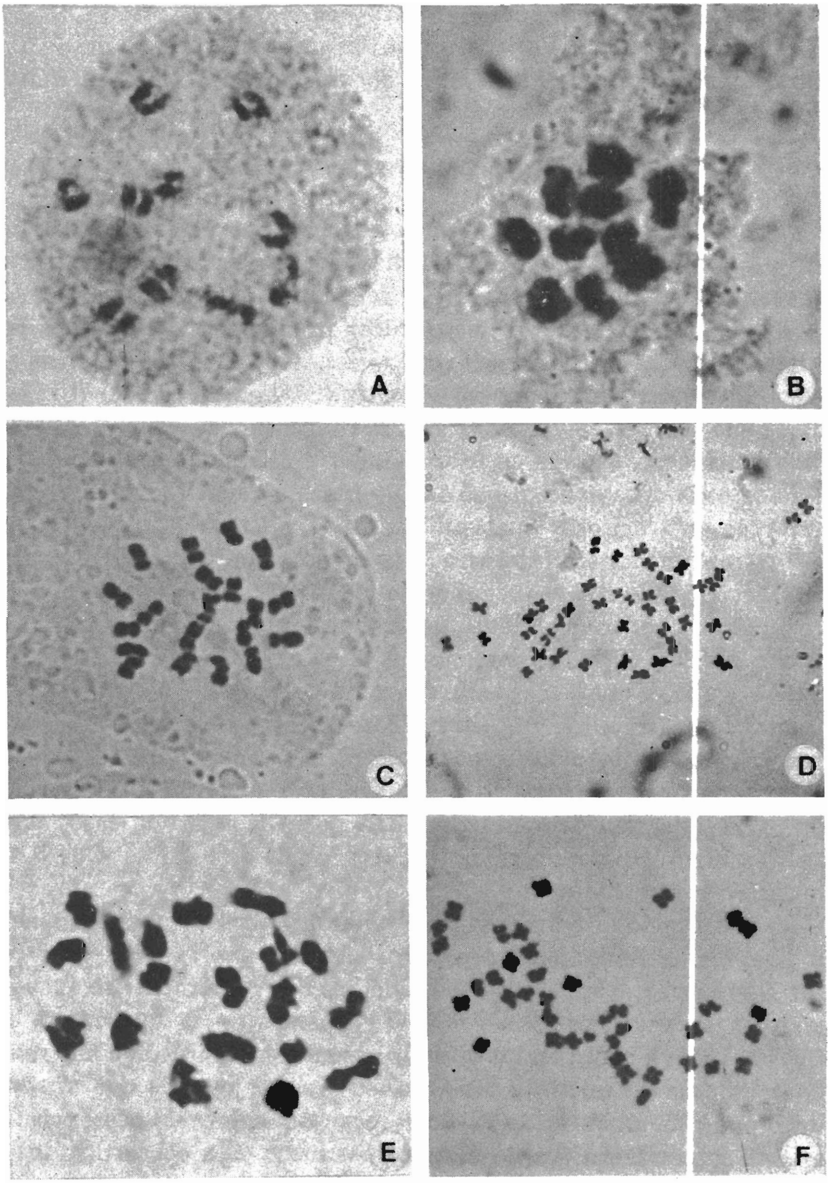
La F_1 del cruzamiento *A. Batizocoi* x *A. hypogaea* cv. 'Colorado Manfredi' no fue analizada citológicamente, pero por ser estéril y por las características cromosómicas de los padres, es evidente que debe haber sido un triploide.

A pesar de la esterilidad de la F_1, en la maceta en que vivió durante 4 años, aparecieron plantas con caracteres combinados de ambos progenitores y que tenían la capacidad de multiplicarse por semillas. Analizadas estas plantas, se comprobó que son tetraploides con $2n = 40$ cromosomas (Lám. I, F) y que en meiosis forman 20 bivalentes, la mayoría cerrados (Lám. I, E). Dichos bivalentes indican que la asociación se debe a la homología de los cromosomas, lo cual es un índice de que los antecesores son especies muy afines.

En las preparaciones obtenidas del tetraploide *A. Batizogaea* aparece un solo par de cromosomas pequeños, aportados indudablemente por la planta polinizadora (*A. hipogaea*).

En un preparado de *A. Batizogaea* se pudo individualizar 3 cromosomas con macrosatélite, que también poseen ambos progenitores.

Considerando que las gametas de *A. Batizocoi* tienen 10 cromosomas y las de *A. hypogaea* tienen 20, el híbrido producido tendría que haber sido triploide, con $2n = 30$ cromosomas. Sin embargo los descendientes del híbrido tienen 40 cromosomas, por lo cual recuperaron la fertilidad, prácticamente ausente en la F_1. Se originó así una línea que se mantiene constante en sus caracteres morfológicos y que tiene un alto grado de fertilidad del polen



Lám. I. — *Arachis Batizocoi:* A, diacinesis, B, metafase I, C, metafase somática. *A. hipogaea:* D, metafase somática. *A. Batizogaea:* E, metafase I, F, metafase somática. A, B, C y E, × 2000; D, × 1100; F, × 1500.

(95 %), por lo cual merece su tratamiento como una nueva especie sintética que denominamos *A. Batizogaea.*

Evidentemente *A. Batizogaea* se originó por la fusión de dos gametas de 20 cromosomas, cuya formación es factible en individuos triploides.

ANALISIS CROMATOGRAFICO (P. S.)

El análisis de flavonoides en hojas de las especies involucradas en el origen de *A. Batizogaea,* utilizando técnicas cromatográficas, aporta nuevos criterios sobre sus relaciones de parentesco.

En general se siguieron las técnicas propuestas y descriptas por Alston y Turner (1963) y Mabry y col. (1970). Estas técnicas ya fueron utilizadas en el género *Arachis* (Seeligmann, 1970) y la importancia de los flavonoides en la filogenia del género *Arachis* también fue presentada en forma sumaria (Krapovickas, 1973),

Para cada ensayo se utilizó 1 g de hojas secadas entre 40 y 50°C, cortadas en trocitos y suspendidos en 10 ml de metanol al 80 %. Se extrajo durante 48 horas a temperatura ambiente. El extracto metílico filtrado fue reducido a sequedad con evaporador a presión reducida o con una corriente de aire caliente. El residuo fue redisuelto en 1 a 2 ml de metanol al 80 %. Este extracto fue utilizado para la cromatografía. Se usaron hojas enteras de papel Whatman 3 MM (46 x 57 cm) para cromatografía, empleándose el método descendiente bidimensional. Para la primera fase se usó una mezcla de butanol terciario, ácido acético y agua en la proporción de 3:1:1 (sistema demoninado TBA) y en la segunda fase, ácido acético al 15 %. Las corridas tardaron de 24 a 28 horas y de 5 a 6 horas respectivamente.

La observación de los perfiles cromatográficos (esquemas o complementos de flavonoides separados sobre el papel) se efectuó con luz UV (aprox. 3.600 Å). Los flavonoides que en *Arachis* se encuentran en su gran mayoría como O-glicósidos de la quercitina, un flavonol muy común en las plantas vasculares, aparecen como manchas oscuras de un tinte violáceo, cuyo color cambia con vapores de amoníaco al amarillo-verdoso, pero su color en presencia de amoníaco cambia al verde o verde parduzco. Los contornos de las manchas se marcaron con un lápiz de plomo para poder comparar los perfiles cromatográficos con luz común.

De cada muestra se obtuvieron dos cromatogramas como mínimo. En los casos que fuese necesario y si se contaba con material suficiente, se repitieron los ensayos.

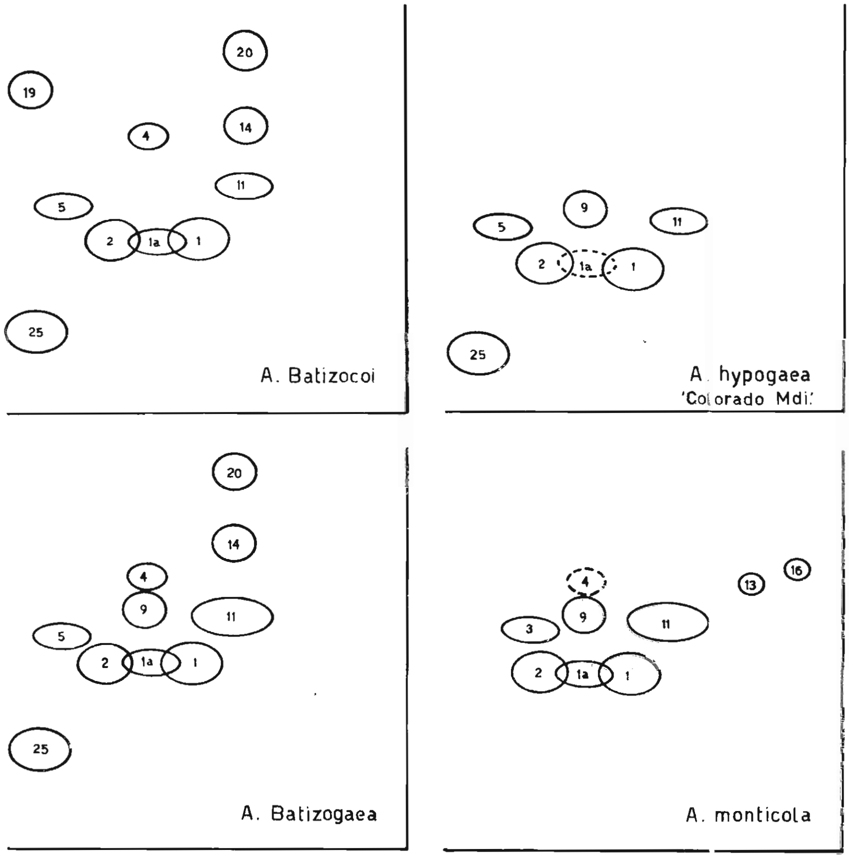


Fig. 3. — Flavonoides: perfiles cromatográficos.

En la figura 3 se presentan los perfiles de *A. Batizocoi*, *A. hypogaea* var. *fastigiata* cv. 'Colorado Manfredi', *A. Batizogaea* y *A. monticola*. Se puede apreciar que los perfiles de las especies progenitoras son diferentes entre sí, con mayor número de manchas en *A. Batizocoi*. El perfil cromatográfico correspondiente a la especie sintética *A. Batizogaea* está constituído prácticamente por la adición de los dos primeros perfiles, dato que concuerda con su origen híbrido.

Es digno de señalar la gran similitud que existe entre los flavonoides de *A. Batizogae* y los de *A. monticola*, aunque no sean exactamente iguales. Este dato puede ser de gran valor para ayudar a interpretar el origen de *A. monticola*.

CONCLUSIONES

Recientemente se demostró en forma práctica la importancia del material silvestre de *Arachis* en el mejoramiento genético del maní cultivado, al crearse el nuevo cultivar 'Spancross', proveniente de un cruzamiento del maní 'Spanish' por *A. monticola* (Hammons, 1970).

Tanto el maní como *A. monticola* tienen 2n = 40 cromosomas, siendo relativamente fácil obtener híbridos entre estas dos especies. En la Estación Experimental de Manfredi (INTA) se han obtenido varias líneas selectas, producto de estos cruzamientos, que están siendo evaluadas en ensayos comparativos de rendimiento.

Las otras especies silvestres de *Arachis* que se pueden cruzar artificialmente con el maní, tienen 2n = 20 cromosomas y producen híbridos estériles triploides (Krapovickas y Rigoni, 1951) (Smartt y Gregory, 1967).

Se han obtenido diversos tipos de poliploides con participación de *A. hypogaea* y los taxones diploides *A. villosa* y *A. duranensis* (Kumar et al., 1957; Kumar & D'Cruz, 1957; Raman & Kesavan, 1963, 1964), presentando la posibilidad de transferir material genético de estas últimas especies al maní cultivado, variando los niveles de ploidía.

La nueva especie sintética *A. Batizogaea*, abre la nueva posibilidad de utilizar otra especie silvestre, *A. Batizocoi*, en el mejoramiento del maní.

Un nuevo planteo surge con respecto al origen de *A. monticola* (Krapovickas y Rigoni, 1957), que se supone un posible antecesor del maní cultivado. La aparición de la especie sintética *A. Batizogaea*, con un parecido apreciable con *A. monticola*, tanto en el aspecto general de las plantas, como en el número de cromosomas y como en los perfiles cromatográficos, permiten suponer que *A. monticola* podría haberse originado de forma similar, a la de *A. Batizogaea*, con la participación del maní cultivado y una especie silvestre diploide.

RESUMEN

Se describe la nueva especie *Arachis Batizogaea* Krap. et Fern., originada de un cruzamiento entre *A. Batizocoi* Krap. et Greg (2n = 20) y *A. hipogaea* L. (2n = 40).

La nueva especie sintética presenta combinados los caracteres de ambos progenitores, manteniéndose relativamente constante durante varias generaciones, reproduciéndose por sí sola. Es tetraploide (2n = 40), con un alto grado de fertilidad y presenta en la meiosis 20 bivalentes, la mayoría cerrados.

El perfil cromatográfico de *A. Batizogaea* está constituído por la adición de los flavonoides de las dos especies progenitoras.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a subsidios otorgados por la Comisión Administradora del Fondo de Promoción de la Tecnología Agropecuaria (CAFPTA) y del Programa Biológico Internacional (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

El Ing. Agr. Aveliano Fernández realizó el estudio citológico durante el uso de una Beca de Iniciación del CONICET y de una Beca de Perfeccionamiento de la UNNE.

Los dibujos fueron realizados por Carlos Schmocker y Víctor Maruñak, a quienes hacemos extensivos nuestro reconocimiento.

BIBLIOGRAFIA

ALSTON, R. E. & B. L. TURNER, 1963, Natural hybridization among four species of *Baptisia (Leguminosae)*. Amer. Jour. Bot. 50 (2): 159-173.

FERNÁNDEZ, A., 1973, El ácido láctico como fijador cromosómico. Bol. Soc. Arg. Bot. 15 (2-3): 287-290.

HAMMONS, R. O., 1970, Spancross - A new peanut variety. University of Georgia. College of Agriculture Experiment Stations, Research Report 76: 1-14.

KRAPOVICKAS, A. y V. A. RIGONI, 1951, Estudios citológicos en el género *Arachis*. Rev. Invest. Agric. 5 (3): 289-294.

KRAPOVICKAS, A. y V. A. RIGONI, 1957, Nuevas especies de *Arachis* vinculadas al problema del origen del maní. Darwiniana, 11 (3): 431-455.

KRAPOVICKAS, A., 1973, Evolution of the genus *Arachis*. En "Agricultural Genetics", ed. R. Moav, Jerusalem, pgs. 135-151.

KUMAR, L. S. S. & R. D'CRUZ, 1957. Aneuploidy in species hybrid of *Arachis*. Jour. Indian Bot. Soc. 36 (4): 545-547.

KUMAR, L. S. S. & R. D'CRUZ, 1957. Aneuploidy in species hybrid of *Arachis*. Current Sci. 26: 121-122.

MABRY, T J., K. R. MARKHAM & M. B. THOMAS, 1970, The systematic identification of flavonoids. Springer Verlag, N. York.

RAMAN, V. S. & KESABAN, P. C., Induced autotraploydy in *Arachis duranensis*. Indian J. Gen. Plant Breed. 23 (3): 320-324.

RAMAN, V. S. & KESAVAN, P. C. 1965, A tetraploid hybrid in *Arachis* and its bearing on differentiation between diploid species. Indian J. Gen. Plant Breed. 25: 80-84.

SEELIGMANN, P., 1970, Un C-glicósido en cuatro especies de *Arachis*. Lilloa, 33 (3): 63-68.

SMARTT. J. & W. C. GREGORY, 1967, Interspecific cross-compatibility between the cultivated peanut *Arachis hypogaea* L. and other members of the genus *Arachis*. Oleagineux, 22 (7): 455-459.